

Molekulárně biochemické vlastnosti tří enzymů, které mohou sloužit jako nové cílové struktury pro navrhování léčiv proti *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum je jednobuněčný, obligatorní a vnitrobuněčný parazit patřící do kmenu Apicomplexa, který může infikovat hospodářská zvířata a člověka. Způsobuje akutní průjem u zdravých, imunokompetentních jedinců, ale může vést až k životu ohrožující, chronické infekci u imunokompromitovaných pacientů. Ačkoliv již bylo testováno mnoho potenciálních léčiv proti kryptosporidii, zatím nebyla nalezena dostatečně účinná léčba. V posledních letech se výrazně prohloubily znalosti metabolických mechanismů tohoto parazita, a to hlavně díky výrazným pokrokům v molekulární biologii a osekvenování genomů *C. parvum* a *C. hominis*. I přesto musíme říct, že naše celkové porozumění specifických metabolických drah je stále limitováno. Jejich detailní charakteristika nám může pomoci přiblížit se k nalezení nových cílových struktur a strategií pro vývoj účinnějších léků proti lidské i zvířecí kryptosporidii.

V této dizertační práci byly testovány tři nepostradatelné enzymy *C. parvum*:

Pyruvát: NADP⁺ oxidoreduktáza (PNO) je unikátní enzym centrálního metabolismu, zodpovědný za přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA. Jedná se o ojediněle se vykytující fúzi dvou domén, N-terminální pyruvátferedoxin oxidoreduktázy a C-terminální cytochrom P-450 reduktázy. Tento enzym se nevyskytuje u člověka a jiných mnohobuněčných organismů, charakterizovaný byl pouze u *Cryptosporidium parvum* a *Euglena gracilis*, kde se nachází v mitochondrii. Jeho lokalizace v kryptosporidiu nebyla známá. Umístění PNO v buňce ovlivňuje jeho biologickou funkci, proto byla ověřena možnost zda by se mohl nacházet v mitochondrii kryptosporidií nebo v jejich cytosolu.

CpNARF je gen, jehož jméno bylo odvozeno od enzymu NARF (Nuclear prelamin A recognition factor), který se vyskytuje v jádře lidských buněk. NARF proteiny vykazují určitou sekvenční podobnost s [Fe] hydrogenázami, ale nemají jejich hydrogenázovou aktivitu. Kryptosporidiový gen byl zaklonován a charakterizován. Jeho doménová struktura a fylogenetická analýza překvapivě odhalila, že předpokládaný kryptosporidiový protein sdílí větší podobnost s NARF-like geny aerobních prvoků a vyšších eukaryotických organismů než s [Fe] hydrogenázami anaerobních prvoků a bakterií.

S-adenosylhomocystein hydroláza je enzym regulující S-adenosylhomocysteinovou metabolickou dráhu a současně regulátor transmetylačních reakcí. Je považován za důležitou cílovou strukturu pro navrhování antivirálních a antiparazitárních léků. I když je přítomen v lidských a savčích buňkách, liší se od nich tento kryptosporidiální enzym svojí rostlinou inzercí. Proto byl vytvořen re-kombinantní enzym, který byl charakterizován a dále testován v přítomnosti potenciálních inhibitorů. Současně byla zjišťována účinnost těchto inhibitorů na růst *C. parvum* v lidských buňkách *in vitro*.